

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」

平成 30 年度分担研究報告書

斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査および
実検体を用いた LAMP 法と比色系パルサー法の検討

研究分担者 佐々木 麻里 大分県衛生環境研究センター
研究協力者 神田 由子、後藤 高志、成松 浩志
大分県衛生環境研究センター
研究協力者 淀谷 雄亮 川崎市健康安全研究所
研究協力者 江川 英明 大分県南部保健所
研究協力者 緒方 喜久代 公益社団法人大分県薬剤師会検査センター

研究要旨：浴場水からのレジオネラ属菌の標準的な検査法を提示する一助として、迅速培養法（斜光法を取り入れた培養法）について平成 21 年度から検討を行っている。平成 30 年度は大分県内施設の浴場水 48 検体を対象に迅速培養法を実施した。その結果、短期間で正確な培養結果を得ることができた。

迅速培養法と併せて、遺伝子検査法（LAMP 法および比色系パルサー法）についても検討を行った。LAMP 法は、培養法でレジオネラ属菌が検出されるにもかかわらず LAMP 陰性となる不一致の結果が散見されていたが、抽出法を変更することにより改善が見られた。比色系パルサー法は、特殊な機器を必要としないため、保健所等監視指導機関等での活用が期待できる方法である。その検証ため、今年度は同一検水を用い、当所の培養検査と平行して、保健所にてパルサー法によるレジオネラ属菌検査を行なった。その結果、培養法ではレジオネラ属菌が検出されたが、パルサー法では陰性となった。

A. 研究目的

浴槽水のレジオネラ属菌の検査法として広く用いられている培養法は結果を得るまでに 7～10 日の長い時間を要する。患者発生時の原因施設特定などの緊急調査時やレジオネラ属菌汚染施設の清掃・殺菌後の安全確認調査など、浴槽水中のレジオネラ属菌の存在あるいは菌数を速やかに把握する必要がある場合は、監視現場からより迅速で、かつ正確な検査が求められている。レジオネラ属菌は、培養 3 日後に分離培地上に出現する小コロニーへ 2 方向から斜に光を照射し、実体顕微鏡下で観察をすると特徴的なモザイク模様を示すことが報告されている¹⁾。そこで、この特徴をレジオネラ属菌の迅速スクリーニングに利用した方法（以下、斜光

法）¹⁾をレジオネラ属菌検査のいわゆる『標準的検査法』に導入することを目的に、大分県内の浴場水の調査の中で、斜光法を取り入れた検査法を併行・継続し、様々な泉質に対する有用性と実効性についての検討を平成 21 年度から重ねている。

また、LAMP 法については、迅速に結果が得られることから、大分県において多用しているが、様々な泉質を有する温泉水等を利用した公衆浴場水等では、培養法でレジオネラ属菌が検出されるにもかかわらず LAMP 法で陰性となる不一致の結果が得られることが多々あり、その解決が課題となっていた。そこで、培養法と LAMP 法の結果不一致検体について、抽出法を変更し、検討を行った。

比色系パルサー法 (Fig. 1) は、レジオネラ属菌特異的 16S rRNA に自己集合体を結合させることで、標的遺伝子を増幅させずに目視で検知する検査法である。測定に特殊な機器を必要としないことから、試験検査機関のみならず監視指導機関等での活用が期待される。昨年度までに、検水ろ過後のフィルターを直接溶菌する方法で良好な結果を得た²⁾ので、今年度の検体に適用し、併せて川崎市健康安全研究所 (以下、川崎市衛研) 監視指導機関である大分県南部保健所衛生課 (以下、保健所) においても同様の方法で実施し、検討した。

以下、培養法でレジオネラ属菌が検出されたこと、LAMP 法・パルサー法で陽性であったことを「(+)」と表記し、培養法でレジオネラ属菌が検出されなかったこと、LAMP 法・パルサー法で陰性であったことを「(-)」と表記する。

B. 研究方法

1. 材料および検査法

平成 30 年 5 月から 10 月に搬入された浴槽水および湯口水、25 施設 48 検体を対象とした。

検査法は新版レジオネラ症防止指針に準じて実施した。すなわち、検水 1200mL をメンブランフィルター (直径 47mm、孔径 0.2 μ m、ADVANTEC 社、POLYCARBONATE) で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水 12mL 入りの滅菌コニカルピーカー (100mL 容量) に移し、ボルテックスミキサーにて 1 分間洗い出しをした。ろ過濃縮後の濃縮検体と、50 で 20 分加熱後急冷した濃縮検体 (加熱処理と表記) をそれぞれ濃縮試料 (100 倍濃縮) とした。

2. 培養法

レジオネラ属菌の分離培地として WYO α 寒天培地 (栄研化学) GVPC 寒天培地 (日研生物) および MWY 寒天培地 (自家製; Oxoid) を用い、非濃縮処理の検水および各濃縮試料について、必要に応じて階段希釈し、その 200 μ L を各分離平板 1 枚にコンラージ棒で塗布し、これらの培地を乾燥しないようにビニール袋に入れ、輪ゴム止めを

した後、36 で培養した。本法における検出感度は 5cfu/100mL である。

培養 3 日後に、2 方向から光を照射し、実体顕微鏡下で各分離培地を観察した。レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYE α 寒天培地 (自家製; Oxoid) および血液寒天培地 (ウマ血, 自家製) に接種し、血液寒天培地での発育の有無を確認すると同時に、EnviroAmp Legionella Kit のプライマー配列³⁾を用いた PCR 法での同定検査を行った。斜光法観察後の分離培地は 36 で 7 日間培養を継続し、分離平板上に出現した灰白色のレジオネラ様コロニーについて、同様の同定検査を行った。最終的に同定されたコロニー数をもって検水 100mL あたりのレジオネラ属菌数に換算した。分離した菌株は、Legionella Latex Test Kit (Oxoid) およびレジオネラ免疫血清 (デンカ生研) を用いたスライド凝集反応により血清群型別を行った。

また、*Legionella pneumophila* SG1 と確認された分離株については *lag-1* 遺伝子の保有の有無について、Kozak ら⁴⁾のプライマー *lag-F* と *lag-R* を用い、PCR 法にて確認した。

3. LAMP 法

濃縮検体 48 検体について、Legionella Detection Kit E (栄研化学) を用い、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA320-C で 1 検体につき 3 回繰り返し測定を行った。

培養 (+) で LAMP (-) となった 2 検体、菌数が多い (100cfu 以上/100mL) にも関わらず LAMP3 回中 2 回 (-) であった 4 検体を含めた 20 検体について、以下の抽出法 (Chelex 抽出法) で再度濃縮検体から抽出、測定し、キットの説明書どおりの抽出法 (常法) と Tt (Threshold time) 値*を比較した。抽出は同じ濃縮検体からで、測定は 3 回繰り返しした。また、前年度²⁾に、レジオネラ属菌数が 1500cfu/100mL で LAMP 陰性であった 1 検体と、6000cfu/100mL で LAMP3 回中 2 回陰性であった 1 検体についても、Chelex 抽出法を適用した。

Chelex 抽出法: 予め Chelex 100 Chelating Resin (BioRad) を 10% w/v になるよう滅

菌蒸留水（遺伝子工学用）に懸濁させ、Chelex 液を調製した。濃縮検体 2mL をチューブに採取し 13,000g で 10 分間遠心した後、50 μ L を残して上清を除去、10%Chelex 液を 50 μ L 添加し、十分に混和した。沸騰水中で 10 分間加熱後、13,000g で 5 分間遠心した上清をサンプルとした。

*Tt 値: LAMP 法で一定の濁度に達するまでの時間(分)。菌数が多いほど値が小さい傾向にある。

4. 比色系パルサー法

大分県衛生環境研究センター（以下、大分衛研）では上記 1 に示す非濃縮検水 48 検体、川崎市衛研では浴槽水や採暖槽水等 39 検体、保健所では浴槽水および湯口水 4 検体について測定した。レジオネラ属菌迅速検査キット（ファスマック）を用い、以下のいずれかの方法（方法 1、方法 2 で目詰まりを起こす場合は方法 3）で溶菌液を調製し、添付の取扱説明書に従って測定を実施した。即日測定できなかった溶菌液については、測定するまで 1 日～4 日間、-30℃ で冷凍保存した。川崎市衛研および保健所では方法 1 のみで実施した。

方法 1：検水 100mL を注射筒に入れて直径 13mm のメンブランフィルター（孔径 0.22 μ m、Merck 社、セルロース混合エステル）に押し出または吸引してろ過し、ろ過後のフィルターを 2mL チューブに移し、100/30 倍に希釈した変性液 100 μ L を加えてボルテックスミキサーで 1 分間混合後、フィルターを下にした状態で 37℃ 15 分間静置し、その後 10 μ L の中和液を加えて溶菌液を調製した。測定にはこの溶菌液の全量 110 μ L を用いた。

方法 2：検水 200mL を注射筒に入れて直径 25mm のメンブランフィルター（孔径 0.22 μ m、Merck 社、セルロース混合エステル）に押し出または吸引してろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌したピンセットで折り畳んで 2mL チューブに移し、100/30 倍に希釈した変性液をろ紙が漬かる量の 200 μ L 加えてボルテックスミキサーで 1 分間混合後、フィルターを下にした状態で 37℃ 15 分間静置し、その後 20 μ L の中和液を加えて溶菌液を調製した。測定には、検水 100mL 分に相当する半量 110 μ L の溶菌液を用いた。

C. 研究結果

1. 培養法

培養結果の概要を Table 1 に示した。48 検体中 24 検体（50%）からレジオネラ属菌が検出された。内訳は「掛け流し・非循環式施設」では浴槽水 19 検体中 12 検体（63%）、湯口水 19 検体中 8 検体（42%）で、「循環式施設」では浴槽水 6 検体中 2 検体（33%）、湯口水 4 検体中 2 検体（50%）であった。

浴槽水と湯口水ともにレジオネラ属菌が検出された施設は 9 施設であった。浴槽水（+）で湯口水（-）となった施設は 4 施設、浴槽水（-）で湯口水（+）となった施設は 1 施設であった（Table 2）。

検出された菌数を Table 3 に示す。検水 100mL あたり 1000cfu 以上検出された検体が 6 検体あり、高菌数の検体が多かった。菌数は最も多い検体で 3500cfu/100mL であった。

斜光法は培養 3 日後を判定日とし、特徴あるモザイク様のコロニーについて確認検査を行った。継続培養後に菌数が増加することはあったが、レジオネラ属菌が検出された 24 検体中 23 検体については、斜光法で（+）を確認することができた。一方、その中には斜光法における検出菌と異なる種類・血清群の菌が継続培養後に検出された検体もあった。斜光法の段階で（+）を確認できなかった 1 検体からは、*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が 1 株のみ（5cfu/100mL に相当）検出された。検出された *L. pneumophila* の血清群別の結果を Table 4 に示した。SG1 株が 2 施設の 3 検体から検出されたが、*lag-1* 遺伝子を保有する株はなかった（Table 5）。

2. LAMP 法

濃縮検体 1 検体につき 3 回繰り返し測定を行い、1 回でも検出された場合は（+）と判定した。常法による結果は Table 6 のとおりで、2 検体が培養（+）で LAMP（-）の不一致の結果となった。当該 2 検体のレジオネラ属菌数は 5cfu/100mL と 55cfu/100mL で、*L. pneumophila* が分離された。

Chelex 抽出法による 20 検体の結果については Table 7 のとおりであった。常法と Chelex

抽出法について、陰性の Tt 値を 60 分として t 検定を実施したところ、全検体間では有意差が見られなかった。しかし、培養で検出された菌数が 50cfu/100mL 以上の 9 検体間では、Tt 値の平均値と標準偏差は、常法で 45.8 ± 9.9 分、Chelex 抽出法で 36.0 ± 10.7 分であり、Chelex 抽出法の Tt 値が有意に低下した ($p=0.012 < 0.05$)、t 検定は対応のある 2 標本間の片側検定で実施した。

また、前年度レジオネラ属菌数が多いにも関わらず常法で LAMP3 回中 3 回または 2 回 (-) であった 2 検体については、Chelex 抽出法で LAMP3 回中 3 回とも (+) であった。

3. 比色系パルサー法

大分衛研で実施した 48 検体の結果を Table 8 に示す。培養法 (+) でパルサー法 (-) の不一致の結果となったのは 2 検体で、*L. pneumophila* が分離され、菌数は 10cfu/100mL と 100cfu/100mL であった。

川崎市衛研で実施した 39 検体中、培養 (+) (川崎市衛研の方法で実施、100mL あたり 10cfu 以上を (+) とした。) の検体は 4 検体あり、全てパルサー法は (-) であった (Table 9)。いずれも *L. pneumophila* が分離され、菌数は 3 検体が 10cfu/100mL、1 検体が 120cfu/100mL であった。一方、パルサー法 (+) となった 5 検体のうち 2 検体は温泉水を使用した浴槽水で、非常に濃い色を呈した。なお、パルサー法に供した 39 検体のうち、この 2 検体を除く 37 検体は水道水を原水とする検体であった。

保健所で実施した 4 検体の結果は Table 10 のとおりで、全て培養 (+) / パルサー (-) の結果となった。

D. 考察

斜光法は高価かつ特殊な機器を必要とせず、簡便で迅速な結果が得られる培養法として、非常に有用な方法である。培養 7 日以降で発育を認めるレジオネラ集落もあるため、培養 3 日後での陰性の判定はできないが、3 日後の時点で観察・同定し、速報することで、速やかな行政対応につなげることが可能となる。少ない菌数のレジオネラ属菌が他の多数の菌に紛れているような

状況でも、斜光法における特徴的なモザイク様の形態は、平板上に発育したコロニーを見分ける際の分かりやすい手がかりとなり、検査の迅速化だけでなく精度向上にもつながると考える。

LAMP 法について、50cfu/100mL 以上のレジオネラ属菌数が検出された検体については、Chelex 抽出法を用いることで Tt 値が有意に低下した。これは、LAMP (+) となる回数が増えたことを反映している。常法と Chelex 抽出法による抽出物について、レジオネラ 16S rRNA 遺伝子コピー数を測定したところ、Chelex 抽出物のコピー数の方が少なかった (データ未掲載)。このことから、Chelex 抽出法により抽出された遺伝子コピー数が増えたからではなく、何らかの反応阻害を低減できたために LAMP (+) の回数が増え、Tt 値が低下したと考えられる。レジオネラ属菌数が 5cfu/100mL の 3 検体については全く改善されなかったが、LAMP キット添付の説明書では 60cfu/test が検出限界とされており、また、菌数が非常に多いにもかかわらず LAMP (-) であった検体についても Chelex 抽出法では (+) となったことから、Chelex 抽出法は偽陰性を減らすのに有効な抽出法であると考ええる。

比色系パルサー法について、機器の揃った検査機関以外で実施することを想定し、実際に保健所での検査を行ったが、培養 (+) にもかかわらずパルサー法では全て (-) となった。川崎市衛研においても、培養 (+) の検体がパルサー法では (-) となった。保健所においては、溶菌液調製後に窓口対応が生じ、測定を開始するまで約 1 時間冷蔵保存した。パルサー法は RNA を検出する方法で、溶菌液中の RNA は時間の経過とともに加水分解されて減少するが、1 時間冷蔵保存による影響の有無については未検証である。一方、大分衛研で実施した 48 検体については、培養 (-) でもパルサー (+) となる検体が多かった。大分衛研の検体は温泉水が多く、保健所の検体および川崎市衛研の多くの検体は水道水である。川崎市衛研において温泉水の検体が濃い発

色を呈したことから、水質の違いが発色に関与している可能性もあるが、今後の検討課題としたい。また、前年度までの検討²⁾から、パルサー法の溶菌工程は、検水をろ過したフィルターを直接溶菌処理するが、ろ過をするにはその場でシリンジを長時間押し続ける必要があり、窓口対応等で中座の多い保健所監視員の実施には困難が予想され、濃縮工程の再検討が必要である。

E. 結論

培養法の迅速化、精度向上を図るにあたって、斜光法は有用である。斜光法を含めた標準的検査法を提示し、精度の高いレジオネラ属菌検査を普及するための研修システム確立に向け、尽力したい。

LAMP 法については、抽出法を変更することにより、培養 (+) で LAMP (-) の不一致が解消されることが示唆された。多様な泉質を有する大分県の浴場水検査において Chelex 抽出法を導入する予定である。

一方、機器の揃った検査機関以外でもレジオネラ属菌の検査が可能になることは公衆浴場等の衛生管理の一助となる。パルサー法が有効に活用できるよう、今後の検討を図っていきたい。

参考文献

- 1) 森本洋：分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性．日本環境感染学会誌，2010．25 (1): 8-14
- 2) 佐々木麻里 他：斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査と比色系パルサー法感度向上のための検討．厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理

対策総合研究事業）「公衆衛生等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 29 年度総括・分担研究報告書：71-77

- 3) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル（レジオネラ症）平成 23 年 10 月 7 日改訂，
- 4) Kozak et al. : Distribution of lag-1 alleles and sequence-based types among Legionella pneumophila serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. J Clin Microbiol. 2009. 47(8) : 2525-2535

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 佐々木麻里、神田由子、後藤高志、成松浩志：あるレジオネラ症集団発生における積極的疫学調査、第 64 回大分県公衆衛生学会、2019 年 3 月、大分。

2. 研修会

- 1) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 30 年度環境監視員担当者会議、2018 年 4 月、大分。
- 2) 佐々木麻里：大分県のレジオネラ症とレジオネラ検査について、レジオネラ症防止対策講習会、2018 年 9 月、大分。
- 3) 佐々木麻里：加湿器を原因とした老人福祉施設でのレジオネラ症集団発生事例～検査について～、平成 30 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2019 年 2 月、東京。

- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Fig. 1 比色系パルサー法 (出典：検査キット取扱説明書)

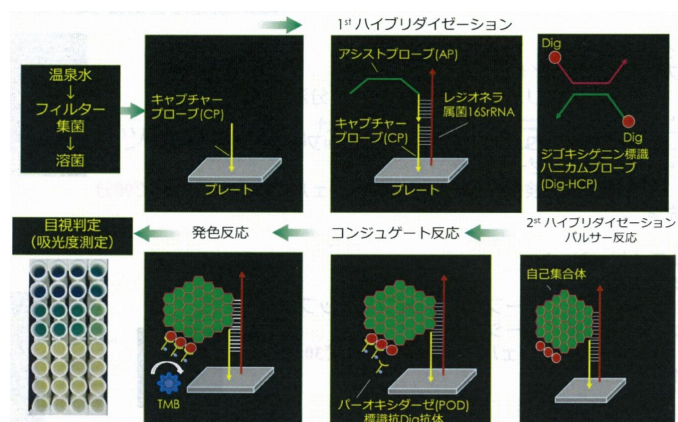


Table 1 培養法の結果

採水箇所		検体数	検出数 ^a	検出率
掛け流し式 非循環式	浴槽水	19	12	63%
	湯口水	19	8	42%
循環式	浴槽水	6	2	33%
	湯口水	4	2	50%
計		48	24	50%

^a 10cfu/100mL によらない (定性)

Table 2 浴槽水と湯口水の検出状況 (n=23)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	9	1	10
	-	4	9	13
計		13	10	23

+ は 10cfu/100mL によらない (定性)

Table 3 培養法の検出菌数別検体数 (n=48)

菌数	検体数
5 未満	24
5 - 9	4
10 - 99	5
100 - 999	9
1000 以上	6
合計	48

Table 4 血清群別の陽性検体数 (n=24)

血清群	検体数
SG1	3 (3)
SG2	4 (4)
SG3	10 (9)
SG4	8 (7)
SG5	5 (4)
SG6	7 (7)
SG7	2 (2)
SG13	1 (1)
SG15	1 (0)
SGUT	10 (9)

複数の血清群が同時に検出された検体あり
()内は斜光法で確認された検体数再掲

Table 5 浴場水における lag-1 検出状況

	lag-1 検出		SG1 検出		培養法検出		検査数	
	施設数	検体数	施設数	検体数	施設数	検体数	施設数	検体数
H24 年	0	0	6	8	23	29	29	47
H25 年*	0	0	0	0	7	10	9	17
H26 年	0	0	4	4	15	22	28	56
H27 年	0	0	5	6	15	25	25	50
H28 年	1	2	1	2	8	15	20	39
H29 年	0	0	7	10	12	20	25	49
H30 年	0	0	2	3	15	24	25	48

*血清群データのある検体のみ計上

培養法は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 6 LAMP 法と培養法の比較 (n=48)

	LAMP		計
	+	-	
培養法	+	22	24
	-	8	24
計		30	48

培養法 + は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 7 Chelex 抽出法と常用による LAMP 法結果 (20 検体 60 テスト)

培養結果 菌数(/100mL)	Chelex 抽出法 LAMP		常法 LAMP
	検体数	陽性検体数	陽性検体数
	テスト数	陽性テスト数	陽性テスト数
5cfu 未満	8	2	3
	24	6	5
5cfu	3	1	2
	9	1	4
50cfu 以上	9	8	8
	27	22	13
合計	20	11	13
	60	29	22

Table 8 パルサー法と培養法の比較
(大分衛研 n=48)

	パルサー		計
	+	-	
培養法	+	22	24
	-	15	24
計		37	48

培養法 + は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 9 パルサー法と培養法の比較
(川崎市衛研 n=39)

	パルサー		計
	+	-	
培養法	+	0	4
	-	5	35
計		5	39

培養法 + は 10cfu/100mL 以上

Table 10 保健所実施パルサー法結果

	採水年月	種類	泉質	培養結果 菌数(/100mL)	パルサー法 結果
1	2019年1月	掛け流し 浴槽水	水道水	25cfu	陰性
2	2019年1月	掛け流し 湯口水	水道水	15cfu	陰性
3	2019年1月	掛け流し 浴槽水	水道水	85cfu	陰性
4	2019年1月	掛け流し 湯口水	水道水	85cfu	陰性